

一种新型免疫传感器阵列检测癌胚抗原和糖类抗原 199 技术

周 靖, 胡富陶*, 余红卫

(宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 制备了一种新型的含 2 个包覆分子印迹聚合物的丝网印刷碳工作电极的电化学发光夹心免疫传感器阵列, 通过该阵列实现了肿瘤标志物癌胚抗原(CEA)和糖类抗原 199 (CA199)的近同时免疫分析. 该新型的电化学发光免疫方法将空间分辨技术与分子印迹技术相结合, 为 CEA 和 CA199 的复合免疫分析提供了一条简单、低成本、快速和灵敏的途径. 该方法对临床实验中多种蛋白质的近同时测定也显示了较大的潜力.

关键词: 分子印迹; 电化学发光; 免疫传感器; 疾病标志物

中图分类号: O657

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2015) 04-0084-06

肿瘤标志物是出现于血液和组织中与癌症有关的分子, 其鉴别和测定在临床诊断和治疗中至关重要^[1]. 然而, 由于大多数标志物对某一特定的肿瘤不是特异性的, 所以限制了其对单个肿瘤标志物的检测. 到目前为止, 各种各样的基于空间分辨、多标签和单向化学发光多路复用免疫分析的免疫分析法和免疫传感器已被用来实现多种待测物同时检测^[2-12]. 在诸多方法中, 电化学发光免疫分析法因其高灵敏度、简单的仪器设备和宽动态范围而成为主导的分析方法之一^[13]. 尽管其在该领域有一些进步, 但仍需要探索一种成本低、简易和多路复用能力的新方法.

笔者基于空间分辨模式, 用一个无交叉感染的夹心免疫传感器阵列设计了一种新型的近同时检测 CEA 和 CA199 的分子印迹 ECL 免疫分析法. 作为检测器的光电倍增管, 采用自制的单刀双掷开关, 被用来依次获取所有免疫传感器的 ECL 信号. 该方法避免了由电活性产物和发光信号导致的交叉感染. 用 PLL 作为 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的共反应物, ECL 强度被大大增加. 此外, $\text{Ru}@\text{Si}@\text{PLL}-\text{Au}$ 纳米复合物的制备将 PLL 和 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 结合起来构建信号探针, 避免了电解质中共反应物的加入, 从而简化了实验步骤. 同时, 通过电聚合方式在电极表面

形成对抗原有识别作用的聚多巴胺印迹膜, 避免了一抗的使用并进一步降低了实验成本. 因此, 该免疫传感器阵列提供了一种快速、低成本和高灵敏的检测方法, 在临床免疫学中有一定的应用前景.

1 实验

1.1 化学品和试剂

癌胚抗原(CEA)、糖类抗原 199(CA199)CEA 和 CA199ELISA 试剂盒均购自郑州博赛生物技术股份有限公司; 盐酸多巴胺和 $\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); 正硅酸四乙酯购自百灵威化学技术有限公司; 多聚左旋赖氨酸(PLL, 分子量为 30 000~70 000 Da)购自上海源叶生物科技有限公司; 二烯丙基二甲基氯化铵(PDDA, wt 20%)购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); 3% PDDA 储备液在含三羟甲基氨基甲烷和氯化钠的去离子水中由原液稀释制备; 氯金酸(HAuCl_4)和牛血清蛋白(BSA, 96%~99%)购自国药(上海); 金纳米粒子(Au NPs, 直径约 15 nm)根据文献^[14]报道的步骤制备. 其他试剂均为分析纯. 含 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 和 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)被用作电解质溶液. 洗涤缓冲液由含 0.05% Tween 20 的 PBS (pH 7.4)构成. 洗脱液是

收稿日期: 2014-10-08.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 浙江省公益技术应用研究 (2012C37012); 宁波市自然科学基金 (2013A610163).

第一作者: 周靖 (1989-), 男, 湖南衡阳人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 分析化学. E-mail: zhouhuijie@nbu.edu.cn

*通信作者: 胡富陶 (1964-), 男, 浙江磐安人, 高级实验师, 主要研究方向: 食品安全与检测. E-mail: hufutao@nbu.edu.cn

1%的十二烷基硫酸钠(SDS). 去离子水被用在所有的实验中.

1.2 仪器

电化学发光实验用一个配有光电倍增管和恒电位仪的 MPI-B 型号电化学发光分析仪(西安瑞迈分析仪器有限公司)进行. 阵列中的 2 个免疫传感器可依次连接到 ECL 分析仪的恒电位仪上借助自制的单刀双掷开关执行信号引发. 发射扫描电子显微镜(FE-SEM, SU-70, Hitachi, Japan)和紫外—可见分光光度计(TU-1910, 北京普析通用仪器有限公司)被用来表征纳米粒子的表面形貌和逐步合成.

1.3 Ru@Si@PLL-Au/Ab 复合物的制备

Ru@SiO₂ 纳米粒子根据文献[15]合成, 即将 60 μL NH₄OH (25%)加入到由 TX-100 (1.77 mL)、环己烷(7.5 mL)、正己醇(1.8 mL)、0.1 mol·L⁻¹ Ru(bpy)₃²⁺ (80 μL)、正硅酸四乙酯(TEOS, 100 μL)和水(340 μL)构成的混合物中, 室温搅拌 24 h. 之后, 加入适量的丙酮并超声 10 min, 再用乙醇和水各洗涤 3 次, 得到橙黄色的 Ru@SiO₂ 纳米粒子. Ru@Si@PLL-Au 纳米复合物按下述步骤制备: 首先将 20 mg Ru@SiO₂ 纳米粒子和 10 mg PLL 分散于 5 mL H₂O 中, 室温搅拌 1 h, 离心, 用去离子水洗涤 2 次除去多余的 PLL, 并分散于 3 mL 水中制得 Ru@Si@PLL 溶液. 随后, 将 100 mL Au NPs 溶液加到上述溶液中, 室温搅拌 8 h. 产生的 Ru@Si@PLL-Au 纳米复合物通过离心和水洗收集后分散于 1 mL 的去离子水中. Ru@Si@PDDA-Au 纳米复合物的制备步骤除了用 PLL 代替 PDDA 外其他与上述相同. 然后, 将 1 mL Ru@Si@PLL-Au 纳米复合物溶液与过量的抗体(CEA 抗体或 CA199 抗体)混合, 并在 4℃下搅拌 24 h. 离心洗涤后便得到 Ru@Si@PLL-Au/Ab 复合物. 用 BSA 封闭阻止非特异性结合位点, 再离心用 PBS (pH 7.4)洗涤, 分散于 PBS (pH 7.4)中并保存于 4℃下备用.

1.4 SPCE 和印迹 ECL 免疫传感器阵列的制备

可处理的 SPCE 阵列参照文献[16]制备, 其含有 2 个并排的碳工作电极(WE₁ 和 WE₂), 一个碳辅助电极(CE)和 1 个 Ag/AgCl 参比电极(RE). SPCE 阵列制备如下: 将灰银墨水首先丝网印刷到一个透明的聚对苯二甲酸乙二醇酯基质的表面充作导电通道. 然后将炭黑墨水印刷到界定的区域作为

工作电极和辅助电极. 之后印刷氯化银墨水充作参比电极. 最后在电极周围应用绿色的绝缘墨水暴露导电通道的电接触器, 形成用作可容纳体积为 40 μL 溶液的反应池的一个圆形区域.

为制备 PDA 印迹的免疫传感器阵列, 实验将 10 μL 含 5 mmol·L⁻¹ DA 的 PBS (0.1 mol·L⁻¹, pH 7.4) 和 10 μL 模板分子(10 ng·mL⁻¹ CA199 或 15 ng·mL⁻¹ CEA 溶液)的混合液利用循环伏安法在 -0.5~0.5 V 范围内以 20 mV·s⁻¹ 的扫描速率扫 20 圈. 之后用 1% SDS 和去离子水反复不断地洗涤以把结合的模板分子从修饰电极(WE₁ 和 WE₂)上洗脱. 最后将得到的免疫传感器储存于 4℃下备用. 非印迹免疫传感器阵列的制备除不加模板分子外, 其余步骤与上述相同.

1.5 检测 CEA 和 CA199 的 ECL 分析步骤

为了执行免疫反应和 ECL 检测, 15 μL 不同浓度的 CEA 和 CA199 溶液分别被滴加到阵列的相应电极上并在室温下干燥. 用 PBS 洗涤后, 将 30 μL Ru@Si@PLL-Au 标记的 2 种不同抗体(Ru@Si@PLL-Au/Ab)分别置于制备的 2 个工作电极上. 室温干燥后, 将未结合的 Ru@Si@PLL-Au/Ab 洗掉. 之后将获得的免疫传感器阵列浸没于 15 μL PBS (0.1 mol·L⁻¹, pH 7.4)中. 借助于单刀双掷开关, 2 个 ECL 免疫传感器被依次置于电路中通过将一个二阶电位(9 s 脉冲周期, 1 s 脉冲时间, 1.3 V 脉冲电位和 0.5 V 起始脉冲电位)应用到工作电极上, 以 100 mV·s⁻¹ 的扫描速度进行 ECL 检测. 这 2 个 ECL 信号被 PMT 依次收集实行 CEA 和 CA199 的近同时分析.

1.6 ECL 吸附性测定

为研究 MIPs 和 NIPs 的吸附性, 实验分别将由 MIPs 和 NIPs 修饰的电极阵列用来吸附不同浓度的 CEA (0~500 pg·mL⁻¹)和 CA199 (0~400 pg·mL⁻¹). 随后的步骤与 1.5 节同.

2 结果与讨论

2.1 MIPs 的表征

图 1 显示了 1~20 圈内电聚合过程中 10 μL 含 5 mmol·L⁻¹ DA 的 PBS (0.1 mol·L⁻¹, pH 7.4) 和 10 μL 模板分子(10 ng·mL⁻¹ CA199 或 15 ng·mL⁻¹ CEA 溶液)的混合液的循环伏安图.

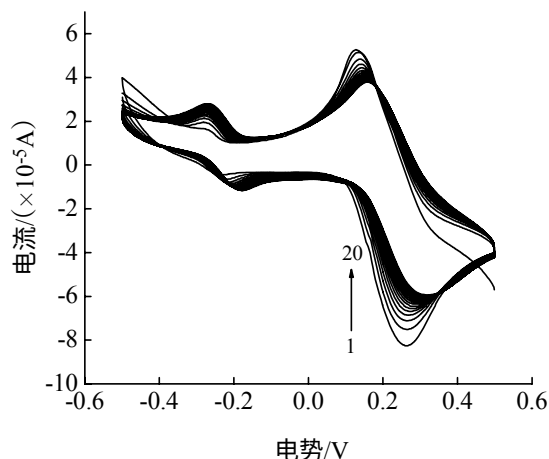


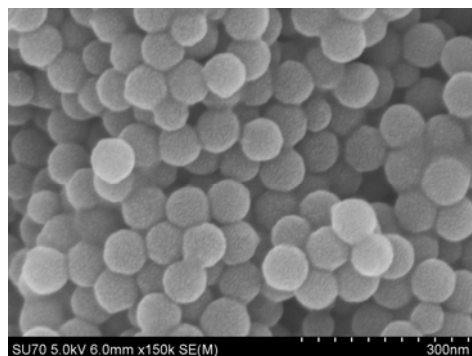
图1 1~20圈内电聚合过程中混合液的循环伏安图

从图1可知,随着扫描圈数的增加各电流峰强度均有所降低,并且没有与聚合物本身氧化还原过程相关的电流峰.这表明电极表面被逐渐覆盖,从而抑制电流响应的紧凑并绝缘的聚多巴胺膜的形成.此外,在相同条件下(除没加模板蛋白质外),得到的循环伏安图与图1没有明显的差别.在同样扫描条件下的模板蛋白质没有观察到明显的氧化还原峰.这些结果表明,模板蛋白质在所用聚合电位范围内的SPCE电极上不具有电活性,并且当聚合物在其周围生长时其结构不会发生电化学变化.

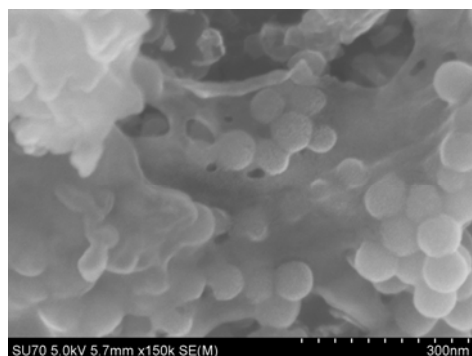
2.2 Ru@Si@PLL-Au 纳米复合物的表征

Ru@SiO₂、Ru@Si@PLL 和 Ru@Si@PLL-Au 纳米复合物的 SEM 如图2所示.合成的 Ru@SiO₂ 纳米粒子尺寸较为均一,平均粒径约 60 nm (图2(a)).当用 PLL 修饰后,纳米粒子的表面出现了一层絮状的薄膜(图2(b)),这表明 PLL 上的一NH₂与 Ru@SiO₂ 表面的一OH 通过静电引力结合了.当其进一步与 Au 纳米粒子结合后,表面出现许多粒径在 10~20 nm 之间的小白点,表明 Ru@Si@PLL-Au 纳米复合物被成功制备.

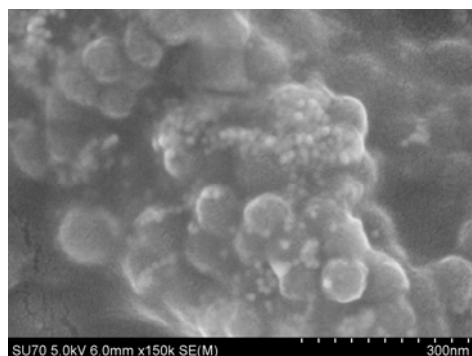
紫外可见光谱分析被用来证实 Ru@SiO₂、Ru@Si@PLL 和 Ru@Si@PLL-Au 纳米复合物的逐步合成.图3中 PLL 的紫外可见光谱显示在 206 nm 处有一个吸收峰.根据文献[17],图3中 286 nm 和 455 nm 处的峰代表了 Ru@SiO₂ 的特征吸收.当 Ru@SiO₂ 纳米复合物修饰 PLL 后,其吸收光谱在 203 nm 处出现了一个吸收峰.这是由于 Ru@SiO₂ 和 PLL 间的静电相互作用导致 PLL 的吸收峰发生



(a) Ru@SiO₂

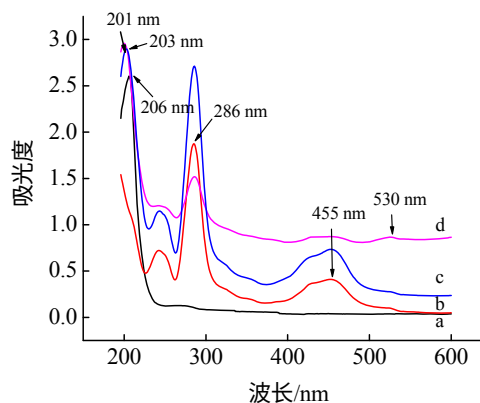


(b) Ru@Si@PLL



(c) Ru@Si@PLL-Au

图2 纳米复合物的扫描电镜图



a 为 PLL; b 为 Ru@SiO₂; c 为 Ru@Si@PLL; d 为 Ru@Si@PLL-Au

图3 纳米复合物的紫外可见光谱

了小的蓝移. 图3(d)中530 nm处的峰归属于Au纳米粒子^[18], 这表明了带负电的Au纳米粒子通过强烈的静电相互作用被连接到了大量氨基修饰的Ru@SiO₂纳米复合物表面.

2.3 复合免疫分析的条件优化

为了获得更好的ECL响应值和免疫分析条件, 我们利用单一变量法优化了一些条件, 包括多巴胺电聚合圈数对Ru@Si@PLL-Au-Ab溶液ECL强度的影响(图4)和模板分子的用量(图5).

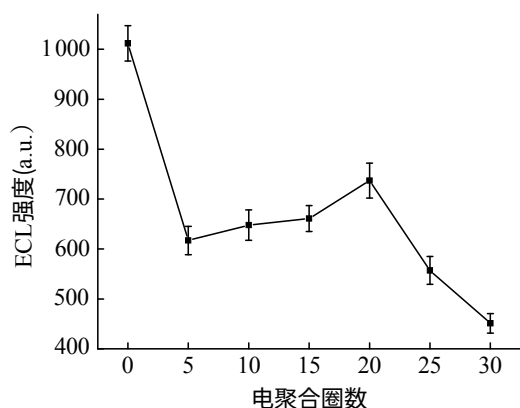


图4 多巴胺电聚合圈数对 Ru@Si@PLL-Au-Ab 溶液 ECL 强度的影响

从图4可知, 开始时随着多巴胺电聚合圈数的增加, Ru@Si@PLL-Au-Ab溶液的ECL强度急剧下降, 这是由于多巴胺在电极表面上反应形成的聚多巴胺膜是惰性导电物质. 然后当聚合圈数继续增加时, ECL强度逐步上升, 这是由于多巴胺上大量的氨基增强了Ru(bpy)₃²⁺的ECL. 之后当聚合圈数超过20后, ECL强度突然降低, 这是由于聚多巴胺膜对Ru(bpy)₃²⁺ECL的抑制作用超过了其增强作用. 因此, 实验选择电聚合圈数为20.

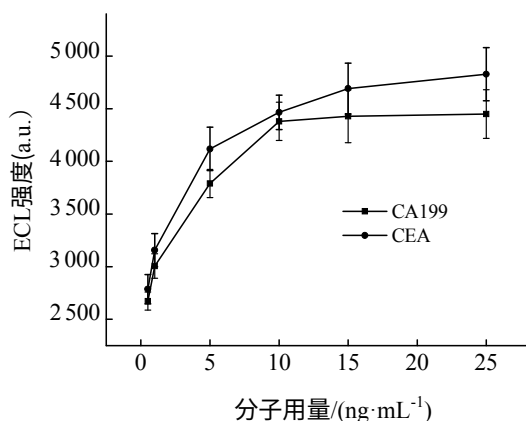


图5 模板分子用量的优化

为了获得最佳的模板分子用量而不浪费实验原料, 实验选用不同量的CA199和CEA合成印迹聚合物, 洗脱后分别用来富集80 pg·mL⁻¹ CA199和100 pg·mL⁻¹ CEA, 然后再分析构建的免疫传感器. 从图5可以发现, 随着模板分子用量的增加, 所得的ECL值随之增大, 之后趋于平缓. 故本实验选择CA199用量为10 ng·mL⁻¹, CEA用量为15 ng·mL⁻¹.

2.4 吸附性实验

为了研究电极阵列上修饰的MIPs和NIPs对相应模板分子的吸附性能, 实验测定了其吸附CEA (0~500 pg·mL⁻¹) 和CA199 (0~400 pg·mL⁻¹) 后构建的免疫传感器的ECL强度. 实验表明, ECL信号随着模板分子初始浓度在一定范围内(0~100 pg·mL⁻¹ CEA, 0~80 pg·mL⁻¹ CA199)的增加而增加, 在某一浓度(100 pg·mL⁻¹ CEA, 80 pg·mL⁻¹ CA199)时达到平衡. 此外, MIPs显示在同浓度下比NIPs更高的ECL, 这表明实验浓度范围内MIPs的特定性吸附和NIPs的非特异性结合.

2.5 分析性能

对ECL信号随CEA和CA199浓度变化的响应研究表明, ECL峰强度均随着待测物浓度的增加而增加. 说明该免疫分析法为临床早期诊断提供了良好的应用前景.

为了研究免疫传感器阵列的特定性, 实验分析了在50 pg·mL⁻¹ CEA和CA199的标准溶液中添加干扰物的发光情况. 5%的相对误差可当作是外来物质可忍受的浓度. 结果表明, 1 μg·mL⁻¹ HlgG, 1 μg·mL⁻¹ BSA和100 ng·mL⁻¹ AFP对CEA和CA199的测定没有干扰.

免疫传感器阵列的可重复性通过组间精密性进行了研究. 实验利用2组不同浓度的待测物评估了组间精密性. 每组用6个免疫传感器阵列测定6次. 所得的相对标准偏差为4.26%(针对10 pg·mL⁻¹ CEA和CA199)和3.75%(针对1 pg·mL⁻¹ CEA和CA199), 表明了可接受的精密性和高重复性.

此外, 实验也研究了免疫传感器阵列的稳定性. 在PBS (pH 7.4)中于4℃下储存3周后, 原信号响应90%以上可维持.

2.6 实际样品中的应用

为了监控所提出的免疫装置在临床分析中的可行性, 实验将取自南方医院的3个人血清样品进

行了稀释和分析. 回收率实验结果表明 CEA 和 CA199 的回收率分别在 96.2%~105.4%和 92.9%~101.1%间变动, 对应的 RSD 分别在 3.8%~7.1%和 4.2%~6.7%间变动(表 1). 这表明该方法可初步用来检测超痕量的 CEA 和 CA199. 此外, 为进一步证实该方法, 将上述 3 人血清用商业化的 ELISA 法进行了测试, 相应的结果见表 2. 与 ELISA 方法所得的检测值相比, 本方法的相对误差不高于 4.03%, 表明准确度可接受. 基于这些结果, 该方法有望用于高灵敏并可可靠地检测 CEA 和 CA199.

表 1 人血清样品中 CEA 和 CA199 的加标回收结果

样品	CEA			CA199		
	1	2	3	1	2	3
初始值/(pg·mL ⁻¹)	5.40	3.78	7.23	14.42	16.51	21.27
增加值/(pg·mL ⁻¹)	5.00	5.00	5.00	15.00	15.00	15.00
最终值/(pg·mL ⁻¹)	10.21	8.92	12.50	28.35	31.68	35.52
相对偏差/%	3.8	6.3	7.1	4.2	6.7	5.2
回收率/%	96.2	102.8	105.4	92.9	101.1	95.0

注: 实验前入血清样品稀释 3 000 倍.

表 2 2 种方法测定病人血清样品结果比较

样品	CEA			CA199		
	1	2	3	1	2	3
本实验法/(pg·mL ⁻¹)	16.20	11.34	21.69	43.26	49.53	63.81
ELISA 法/(pg·mL ⁻¹)	15.72	11.68	20.94	44.13	47.61	61.55
相对偏差/%	3.05	-2.91	3.58	-1.97	4.03	3.67

3 结语

构建了一种新型的含 2 个包覆有 MIPs 的丝网印刷碳工作电极的 ECL 夹心免疫传感器阵列, 通过该阵列实现了 CEA 和 CA199 的近同时免疫分析. 由电聚合所得的聚多巴胺印迹膜显示了对超低浓度 CEA 和 CA199 的高亲和力和富集能力. 另外, 制备的 Ru@Si@PLL-Au 信号标签大大简化了实验步骤, 在这之中 PLL 充作 Ru(bpy)₃²⁺的共反应物, 被用来扩大信号. 再者, 所提出的免疫装置展现了近同时测定 CEA 和 CA199 的优良分析性能. 因此, 该方法的低成本性、简易性和高灵敏度性为当前免疫分析法的改进提供了新的视野.

参考文献:

- [1] Freedland S J. Screening, risk assessment, and the approach to therapy in patients with prostatecancer[J]. Cancer, 2011, 117:1123-1135.
- [2] Wang J, Mi X, Guan H, et al. Assembly of folate-polyoxometalate hybrid spheres for colorimetric immunoassay like oxidase[J]. Chem Commun, 2011, 47: 2940-2942.
- [3] Li H, Leulmi R, Juncker D. Hydrogel droplet microarrays with trapped antibody-functionalized beads for multiplexed protein analysis[J]. Lab on a Chip, 2011, 11: 528-534.
- [4] Tamarit-Lopez J, Morais S, Puchades R, et al. Direct hapten-linked multiplexed immunoassays on polycarbonate surface[J]. Biosens Bioelectron, 2011, 26:2694-2698.
- [5] Yang Z, Liu H, Zong C, et al. Automated support-resolution strategy for a one-way chemiluminescent multiplex immunoassay[J]. Anal Chem, 2009, 81:5484-5489.
- [6] Song Tao, Zhang Qi, Lu Chaoliang, et al. Structural design and preparation of high-performance QD-encoded polymer beads for suspension arrays[J]. J Mater Chem, 2011, 21:2169-2177.
- [7] Barbee K, Hsiao A. Multiplexed protein detection using antibody-conjugated microbead arrays in a micro-fabricated electrophoretic device[J]. Lab Chip, 2010, 10, 3084-3093.
- [8] Agger S, Marney L, Hoofnagle A. Simultaneous quantification of apolipoprotein AI and apolipoprotein B by liquid-chromatography-multiple-reaction-monitoring mass spectrometry[J]. Clin Chem, 2010, 56:1804-1813.
- [9] Hazarika P, Jickells S. Multiplexed detection of metabolites of narcotic drugs from a single latent fingerprint[J]. Anal Chem, 2010, 82:9150-9154.
- [10] Wu J, Yan F. Disposable reagentless electrochemical immunosensor array based on a biopolymer/sol-gel membrane for simultaneous measurement of several tumor markers[J]. Clin Chem, 2008, 54:1481-1488.
- [11] Wu J, Yan Y T. Electric field-driven strategy for multiplexed detection of protein biomarkers using a disposable reagentless electrochemical immunosensor array[J]. Anal Chem, 2008, 80:6072-6077.
- [12] Fu Z F, Liu H, Ju H X. Flow-through multianalyte chemiluminescent immunosensing system with designed substrate zone-resolved technique for sequential detection of tumor markers[J]. Anal Chem, 2006, 78:6999-7005.

- [13] Li Cuifang, Fu Zhifeng, Li Zongyun, et al. Cross-talk-free multiplexed immunoassay using a disposable electrochemiluminescent immunosensor array coupled with a non-array detector[J]. *Biosens Bioelectron*, 2011, 27: 141-147.
- [14] Enüstün B V, Turkevich J. Coagulation of colloidal gold [J]. *J Am Chem Soc*, 1963, 85:3317-3328.
- [15] Zhang L H, Dong S J. Electrogenerated chemiluminescence sensors using $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ doped in silica nanoparticles[J]. *Anal Chem*, 2006, 78:5119-5123.
- [16] Li C F, Fu Z F. Cross-talk-free multiplexed immunoassay using a disposable electrochemiluminescent immunosensor array coupled with a non-array detector[J]. *Biosens Bioelectron*, 2011, 27:141.
- [17] Guo Z H, Shen Y, Wang M K, et al. Electrochemistry and electrogenerated chemiluminescence of SiO_2 Nanoparticles/Tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) multilayer films on indium tin oxide electrodes[J]. *Anal Chem*, 2004, 76: 184-191.
- [18] Grabar K C, Freeman R G. Preparation and characterization of Au colloid monolayers[J]. *Anal Chem*, 1995, 67:735-743.

A New Type of Sensor Array Detection of Carcinoembryonic Antigen and Carbohydrate Antigen 199 Technology

ZHOU Jing, HU Fu-tao^{*}, YU Hong-wei

(School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: In this study, a novel electrochemiluminescence (ECL) immunosensor array is engineered consisting of two screen-printed carbon working electrodes coated with molecular imprinting polymer (MIPs). The array is formed to perform multiplexed immunoassay of tumor markers (carcinoembryonic antigen (CEA) and carbohydrate antigen-199 (CA199)). Based on spatial-resolved technique, and coupled with molecularly imprinted technique, this novel ECL strategy provides a simple, low-cost, fast and sensitive approach for multiplexed immunoassay of CEA and CA199. This approach may render promising potential for protein detection in the circumstances of clinical laboratory setting.

Key words: molecular imprinting; electrochemiluminescent; immunosensor; disease markers

(责任编辑 史小丽)